



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 43 03 646 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁵:
A 61 K 37/02

②1 Aktenzeichen: P 43 03 646.5
②2 Anmeldetag: 9. 2. 93
④3 Offenlegungstag: 11. 8. 94

DE 43 03 646 A 1

⑦1 Anmelder:
BASF AG, 67063 Ludwigshafen, DE

⑦2 Erfinder:
Friedrich, Thomas, Dr., 6100 Darmstadt, DE

⑤4 Die Verwendung von Thrombininhibitoren zur Bekämpfung neurodegenerativer Erkrankungen

⑤7 Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Thrombininhibitoren zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen.

DE 43 03 646 A 1

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von Thrombininhibitoren zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen.

Thrombininhibitoren sind wichtige therapeutische Substanzen, die zur Prophylaxe und Behandlung von Gerinnungsstörungen wie Thrombosen oder arteriellen Reokklusionen bei Herzinfarkt und Hirnschlag (Talbot, M.D. und Butler, K.D., Drug News and Perspectives, 3, 357—363 (1990)) verwendet werden. Bei diesen Krankheiten ist die zentrale Rolle des Thrombins schon lange bekannt (J.W. Fenton II, et al., Blood Coagulation and Fibrinolysis 2, 69—75 (1991)).

Die Koagulation ist ein Prozeß sich kaskadenartig aktivierender Proteasen, an deren Ende die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin steht. Thrombin selbst setzt aus dem Fibrinogenmolekül durch Abspaltung von Peptiden das Fibrin frei. Fibrin polymerisiert zu einem unlöslichen Netzwerk und verschließt Wunden oder — im Krankheitsfall — ein lebenswichtiges Blutgefäß. Unter den zahlreichen Substanzen, die am Thrombin angreifen, lassen sich zwei Substanzklassen unterscheiden: hochmolekulare Stoffe wie Peptide und Proteine (MW > 1000 DA) und niedermolekulare Substanzen.

Zu den hochmolekularen Substanzen gehören Stoffe, die in den Patentanmeldungen WO 92/01710; WO 91/19734 und WO 91/02750 beschrieben sind. Es handelt sich hierbei um Thrombininhibitoren, die mit einem aus dem Hirudin abgeleiteten Peptid, das die Fibrinogenbindungsstelle des Thrombins erkennt, besteht. Dieser funktionelle Molekülteil ist gekoppelt über einen peptidischen oder nicht-peptidischen Linker mit einem die Proteasetasche besetzenden Molekülteil, der vom D—PHE—PRO—ARG-Typ ist.

Noch höhere Molekulargewichte haben Antithrombine aus blutsaugenden Tieren wie Hirudin aus dem Blutegel *Hirudo Medicinalis* (Markwardt, F., Hematology 7, 255—269, (1988)) oder Hirulline aus *Hirudo Mallinensis* (Electricwald, A. et al., Blood Coag. Fibrin. 2, 83—89, (1991)). Neben Egeln sind Zecken, Wanzen und Stechfliegen und Mücken blutsaugende Tiere.

Diese Verbindungen binden in die Proteasetasche des Thrombin und hemmen nur die katalytische Eigenschaft der Serinprotease Thrombin.

Verbindungen, die sich vom C-Terminus des Hirudinmoleküls ableiten sind auch wirksam.

Die Serinprotease Thrombin spielt im Hirn eine wichtige Rolle bei dem Auswachsen von Nervenzellen, um für die wachsenden Neuriten den Weg zu bahnen (Gurwitz, D. und Cunningham, D.D.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 3440—3444 (1988)). Thrombin trennt Gehirnzellen, so daß andere Gehirnzellen Verbindungen aufnehmen können. Wird die proteolytische Aktivität des Thrombin aber nicht mehr kontrolliert, so werden viele Zell-Zell-Verbindungen unterbrochen und es kommt zu neurodegenerativen Erscheinungen.

Darüber hinaus bindet Thrombin an den Thrombinrezeptor und aktiviert ihn durch das Schneiden in der Aminosäuresequenz NATLDPR↓SFLLRNPN zwischen Arginin und Serin. Durch Aktivierung des Thrombinrezeptors werden intrazelluläre Signalprozesse angestoßen und verursachen so einen destruktiven Effekt an der zellulären Architektur (Hana S. et al., Neuron 8, 363—375 (1992)).

Bei diesen Prozessen spielt auch Kalzium eine wichtige Rolle. In der Patentanmeldung WO 92/11850 wird die Verwendung von Calpain-Inhibitoren zur Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen beschrieben. Die beschriebenen Inhibitoren gehören zum Isokumarin-Typ. Sie hemmen neben Calpain auch viele andere Proteasen und sind daher sehr unspezifisch.

Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Thrombininhibitoren zur Herstellung von Arzneimitteln zur Bekämpfung neurodegenerativer Erkrankungen.

Für die Erfindung geeignete Thrombininhibitoren sind hochmolekulare Inhibitoren wie Hirudine, Hirulline und deren Muteine, C-Terminale Hirudinfragmente oder Abwandlungen, Protease Nexin I und Thrombininhibitoren, die aus einem C-Terminalen Peptid des Hirudin oder seiner Abwandlung davon in Verbindung mit einem die Proteasetasche bindenden D—PHE—PRO—ARG bestehen. Die beiden funktionellen Molekülteile werden dabei durch peptidische oder nichtpeptidische Spacer verbunden (WO 92/01710; WO 91/10734; WO 91/02750). Darüber hinaus sind auch Thrombininhibitoren aus blutsaugenden Tieren wie Zecken, Wanzen und anderen Blutegeln geeignet.

Diese hochmolekularen Inhibitoren durchdringen die Blut-Hirnschranke in der Regel nicht.

Die Blut-Hirnschranke kann jedoch durch osmotische Schocks permeabel gemacht werden oder die beschriebenen Substanzen werden direkt in z. B. die Rückenmarksflüssigkeit eingebracht, von wo sie den Wirkort erreichen.

Weitere geeignete Thrombininhibitoren sind niedermolekulare Verbindungen mit einem Molekulargewicht unter 1000 DA.

Als niedermolekulare Thrombininhibitoren sind beispielsweise folgende Substanzklassen bekannt: substituierte Guanidinoalkylderivate, Amidinophenyllderivate, Guanidinophenyllderivate, Lysinderivate, Boronsäure- und Phosphonsäurederivate von Arginin und Lysin.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Arzneimittel, die Thrombininhibitoren und einen Nerve-Growth-Factor enthalten. Solche Arzneimittel eignen sich ebenfalls zur Bekämpfung von neurodegenerativen Erkrankungen.

Unter Nerve-Growth-Factor versteht man ein Protein, das für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des sympathischen Nervensystems und sensorischer Nerven und andere Hirnfunktionen wichtig ist (Borsani, G. et al., Nucleic Acids Res., 18, 4020 (1990)). Es stimuliert Teilung und Differenzierung dieser Zellen.

Unter neurodegenerativen Erkrankungen sind Krankheiten zu verstehen, bei denen die neuronale Organisation des Gehirns durch Krankheiten und Verletzungen direkt oder indirekt lokal oder über weite Gehirnbereiche verteilt, zerstört wird.

Hierzu sind Neurodegeneration infolge von Hyper-Erregung (Excito toxicity), HIV-induzierte Neuropathie,

Ischämie, Subarachnoid Blutung, Schlaganfall, Gehirnverletzungen, Herzinfarkt-Folgeerscheinungen im Hirn, Demenz durch vielfachen Hirnschlag, die Alzheimersche Erkrankung, Huntingtons's Erkrankung und die Parkinson'sche Erkrankung zu rechnen.

Die Thrombininhibitoren können in üblicher Weise oral oder parenteral, subkutan, intravenös, intramuskulär, transdermal, intrasternal, intrathekal auch als Infusion und direkt in das Hirn oder als Spray verabreicht werden.

Die Dosierung hängt vom Alter, Zustand und Gewicht des Patienten sowie von der Applikationsart ab. In der Regel beträgt die tägliche Wirkstoffdosis zwischen etwa 100 µg und 10 mg/kg Körpergewicht bei oraler Gabe und zwischen etwa 10 µg und 10 mg/kg Körpergewicht bei parenteraler Gabe.

Die neuen Verbindungen können in den gebräuchlichen galenischen Applikationsformen fest oder flüssig angewendet werden, z. B. in üblichen galenischen Tabletten, Filmtabletten, Kapseln, Pulvern, Granulaten, Dragees oder Lösungen. Diese werden in üblicher Weise hergestellt. Die Wirkstoffe können dabei mit den üblichen galenischen Hilfsmitteln wie Tablettenbindern, Füllstoffen, Konservierungsmitteln, Tablettensprengmitteln, Fließregulierungsmitteln, Weichmachern, Netzmitteln, Dispergiermitteln, Emulgatoren, Lösungsmitteln, Retardierungsmitteln, Antioxidantien und/oder Treibgasen verarbeitet werden (vgl. Sucker et al, Pharmazeutische Technologie, Thieme-Verlag, Stuttgart, 1978).

Beispiel 1

In vivo Versuche zur Wirkung von Thrombininhibitoren auf die Gedächtnisleistung und die Regeneration des Gehirns nach Läsion.

Die Versuche wurden wie von Casamenti F. et al (Neuroscience Letters 103, 87—91 (1989); Neuroscience 24, 209—215 (1988)) beschrieben, durchgeführt.

Zu diesem Zweck wurden Ratten operiert (einseitige Läsion) oder schein-operiert und durch eine in den lateralen Ventrikel implantierte Kanüle mit Thrombininhibitoren verschiedenster Konzentration behandelt. Zwanzig Tage nach der Läsion begann das Training in einem "two-compartment step through passive avoidance" Apparat. Dabei waren die Ratten in verschiedene Gruppen eingeteilt. Unbehandelte Ratten erhielten Kontrolllösungen verabreicht, bei denen der Thrombininhibitor durch Serumalbumin ersetzt war. Als Thrombininhibitor wurden Hirudin und Protease Nexin-1 eingesetzt. Die Mengen betrugen zwischen 1 µg/kg bis 100 µg/kg Körpergewicht. Beobachtet wird die Latenzzeit des Verweilens in einer beleuchteten Kammer nach Elektroschock in einer benachbarten dunklen Kammer.

Nach der Trainingsphase wurden die Ratten betäubt und das Hirn in situ fixiert. Von so gewonnenen und nachfixierten Gehirnen wurden Schnitte angefertigt und kortikale Cholin-Acetyltransferase positive Neurone mit einem Avidin-Biotin-Antikörpersystem nachgewiesen. Die Auswertung der angefärbten Neuronen erfolgte wie bei Casamenti et al. beschrieben (Zeiss-Kontron IBASII).

Schein-operierte Ratten dienten als Normwert. Operierte aber ohne Thrombininhibitor behandelte Ratten zeigten eine 30 bis 40%ige Abnahme kortikaler Cholin-Acetyltransferase positiver Neurone. Konzentrationsabhängig ist dieser Effekt geringer bei der Gabe von Thrombininhibitoren. So beträgt die Abnahme bei allen eingesetzten Inhibitoren (Hirudin, Nexin-1) nur 10—20% und ist statistisch signifikant. Bei 100 µg/kg befindet man sich schon deutlich im Plateau-Bereich.

Beispiel 2

In vivo Versuche zur Wirkung von Thrombininhibitoren auf die Gedächtnisleistung und die Regeneration des Gehirns durch Alterung.

Die Versuche wurden wie bei Fischer et al (Nature 329, 65—68 (1987)) beschrieben, durchgeführt.

Alte (23—25 Monate), im Verhalten beeinträchtigte oder nicht beeinträchtigte weibliche Sprague-Dawley-Ratten wurden im Wassertank nach Morris (Morris R.G.M., Neurosci. Meth. 11, 47—60 (1984)) getestet. Die beeinträchtigten Ratten wurden zufällig in Kontroll- (1) und Experimentalgruppen (2) aufgeteilt und operiert. Eine mit Kanüle versorgte osmotische Pumpe (Alzet Modell 2002) wurde in den lateralen Ventrikel implantiert. Mit der Hälfte der Kontrollratten wurde gleich verfahren.

Eine Experimentalgruppe erhielt den Thrombininhibitor (Hirudin und Nexin-1) zwischen 10—1000 µg/Woche.

Eine zweite Experimentalgruppe erhielt den Thrombininhibitor (Hirudin, Nexin-1) in einer Konzentration von 10—1000 µg/Woche zusammen mit 1—10 µg Nerve-Growth-Factor.

Kontrollratten erhalten unter Weglassung des Thrombininhibitors (z. B. Hirudin) die gleiche Füllung (eine künstliche Cerebrospinalflüssigkeit mit Serumalbumin der Ratte) der Pumpe mit einer einmaligen Ergänzung nach 2 Wochen.

Die Ratten wurden jeweils nach 1 bis 2 (Test 1) und 3 bis 4 Wochen (Test 2) erneut im Wassertank getestet. Im ersten Test zeigten die mit Thrombininhibitor behandelten, beeinträchtigten Ratten noch keine signifikante Verbesserung ihres Verhaltens und ihrer Leistungen im Vergleich zu den Kontrollratten.

Nach der zweiten Testung war die Leistung im Wassertank deutlich besser als die der Kontrollratten und vergleichbar der Leistung der nicht beeinträchtigten Ratten. Die Verbesserung der Leistungen ist auf ein besseres Bewahren der Erinnerungen aus dem ersten Test zurückzuführen.

Die zweite Experimentalgruppe, die die Kombination aus Thrombininhibitor und Nerve-Growth-Factor erhalten hatte, zeigte deutlich verbesserte Leistungen.

Folgendes Ergebnis wurde erhalten:

	Test 1	Test 2
Kontrolle	O	O
Hirudin	O	++
Nexin-1	O	++
Hirudin + NGF	O	+++
Nexin-1 + NGF	O	+++

O : keine Verbesserung der Leistung

++/+++ : verbesserte / stark verbesserte Leistung

Patentansprüche

1. Verwendung von Thrombininhibitoren zur Herstellung von Arzneimitteln zur Bekämpfung neurodegenerativer Erkrankungen.
2. Arzneimittel, enthaltend Thrombininhibitoren und einen nerve-growth-factor.